

⑫ 特 許 公 報 (B 2)

平1-50382

⑬ Int. Cl.

A 23 J 3/00
A 23 L 1/04

識別記号

庁内整理番号

X-7236-4B
8114-4B

⑭公告 平成1年(1989)10月30日

発明の数 1 (全6頁)

⑮発明の名称 ゲル化物の製造法

⑯特 願 昭57-31978

⑰公 開 昭58-149645

⑱出 願 昭57(1982)3月1日

⑲昭58(1983)9月6日

⑳発 明 者 本 木 正 雄 神奈川県横浜市金沢区釜利谷町1915-59
㉑発 明 者 丹 尾 式 希 神奈川県川崎市川崎区観音2-20-8
㉒発 明 者 滝 波 弘 一 神奈川県横浜市港北区篠原台町3-16-310
㉓出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
審 査 官 佐 伯 裕 子

1

㉔特許請求の範囲

1 蛋白質濃度2重量%以上の蛋白含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上、添加してゲル化させることを特徴とするゲル化物の製造法。

発明の詳細な説明

本発明は新規なゲル化物の製造法に関する。

既存蛋白資源の中には、生物価が低い、機能特性が乏しい等の理由から利用が制限されているものが多い。これらの蛋白資源を意図的に組織化食品に適するような機能性、栄養性を有する蛋白素材の改質する技術が確立されるなら、その利用度が増加するだけでなく、高品質の蛋白食品を作りうる。改質技術の1つとして酵素修飾による改質があるが、現状では加水分解酵素による改質が主なものであり、他の酵素の利用例は少ない。

本発明者らはアシル転移酵素の一つであるトランスグルタミナーゼに着目し、食品蛋白中に含量の多いグルタミン(Glnと略す)残基とリジン(Lysと略す)残基間に架橋を形成させ、ゲル状物質を製造できることを発見し、本発明を完成した。

即ち、本発明は蛋白質濃度2重量%以上の蛋白含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上、添加してゲル化させることを特徴とするゲル化物の製造法である。

本発明に用いられる蛋白質は、その起源に制約されるものではなく植物性蛋白質、動物性蛋白質

2

などいかなるものでも使用できる。植物性蛋白質としては油糧種子の脱脂物(脱脂大豆)及びそれらより分離した蛋白質を挙げることができる。また、動物性蛋白質としては乳蛋白質、ゼラチン、コラーゲン等を例示することができる。

これらの蛋白質の2重量%以上の蛋白含有溶液を調製する。蛋白含有溶液の濃度は比較的高いことが望ましく通常2重量%以上、好ましくは5重量%ないし15重量%であればよい。この場合、澱粉、多糖類、調味料、着色料、香辛料などの食品添加物を配合することができる。これらの使用量は、後のトランスグルタミナーゼによるゲル化を阻害しない範囲で適宜選択して添加すればよい。蛋白溶液の濃度が2重量%より少ない場合には、溶液状態のまま、もしくは沈澱を生じゲル化しない。また、蛋白含有溶液のpHは6ないし9であれば好ましい。

この蛋白含有溶液にトランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上添加してゲル化させる。このトランスグルタミナーゼは Connellanらの方法〔Journal of Biological Chemistry, 246(4)、1093(1971)〕に従って、モルモットの肝臓により調製される。即ち、モルモットの肝臓をシヨ糖溶液に分散させたものを遠心分離し、上清液を回収し、これジエチルアミノエチルセルロースカラムにて分画することによって、粗製トランスグルコシダーゼを得る。これを1%硫酸プロタミンで沈澱させ、沈澱物を回収す

3

る。さらにこの沈澱物を0.2M Tris-酢酸緩衝液で洗浄後、0.05M硫酸-5 mM Tris-HCl緩衝液(2 mMエチレンジアミン4酢酸(以下EDTAと略す)を含む)を用いて抽出し、得られた抽出液をカルボキシメチルセルロースカラムでプロタミンを除去し、口液に硫酸アンモニウム溶液(1M EDTAを含む)を添加し遠心分離を行ない、沈澱物を回収する。沈澱物を10 mM Tris-酢酸緩衝液(1 mM EDTA、0.16M KClを含む)で溶解し、遠心分離した上清液を10 %アガロース(Bio Gel A-0.5M)でゲル濾過し、得られた高活性画分を限外濾過で濃縮し、精製されたトランスグルタミナーゼを得る。

他のトランスグルタミナーゼの調製法としては、Clarkeらの方法[Archives of Biochemistry and Biophysics, 79, 338(1959)]がある。即ち、モルモット肝300 gに、0.25Mシヨ糖溶液600 mlを加え、ホモゲナイズする。これを遠心分離し、上清を得る。

0.01Mとなるよう酢酸ナトリウムを加え、酢酸にてpH5.0に調整し、遠心分離する。得られた沈澱に0.05Mリン酸緩衝液(pH6.5) 30 ml添加したホモゲナイズする。この懸濁液を遠心分離し、その上清を0.001Mリン酸緩衝液(pH7.5)に対して透析し、これを粗トランスグルタミナーゼ溶液として用いる方法である。

これらの方法は、操作順序を変化させたり、添加量、濃度、pH値分離装置などを若干変えても差しつかえない。このようにして得たトランスグルタミナーゼの蛋白濃度をロウリー法[Journal of Biological Chemistry, 193, 265(1951)]で、酵素活性をN-カルボベンゾキシー-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシアミンを用いたヒドロキシサム酸法[Journal of Biological Chemistry, 241(23), 5518(1966)]で測定すれば、調製した酵素溶液の比活性は6.0ないし13.0の範囲の値を示す。また、電気泳動によつて分子量を測定すると8.0万ないし9.0万の範囲の値である。このトランスグルタミナーゼ溶液は-30°C程度の低温にて保存し、適時解凍して使用することができる。

このようにして得られるトランスグルタミナーゼを蛋白1 gに対して1ユニット以上、添加してゲル化させる。添加量が1ユニットより少ない場

4

合には、高粘性の溶液となる。また、2000ユニットより多く添加しても効果はそれほど変わらない。

トランスグルタミナーゼで蛋白分子にGlu-Lys架橋が生じることは知られている(J.E.Folk and J.S.Finlayson "Advances in Protein Chemistry" Vol.31 ed.by C.B.Anfinsen, J.T.Edsall and F.M.Richards, Academic Press Inc., New York, N.Y., 1977, p.1.)が、高い蛋白溶液にトランスグルタミナーゼを作用させた時に生成されるゲルがGlu-Lys架橋によるものである事は、以下の実験データから推察された。

① トランスグルタミナーゼの反応部位となるLys残基をアセチル化及びサクシニル化したαslガゼインにトランスグルタミナーゼを作用させてもゲル化しなかった。

② 反応溶液中に、S-S環元剤であるジチオスレイトールを共存させて反応を行なわせているので、S-S結合を主体とするゲルではない。

③ 加熱・冷却して得られる通常のゼラチンゲルとトランスグルタミナーゼでゲル化させたゼラチンゲルの各々の弾性率を測定したところ、通常のゼラチンゲルは温度が高くなるにつれ、著しく弾性率が低下した。これはゲルの網目構造をつくる架橋が共有結合などのような強い結合でなく、二次的結合であるため、温度上昇とともにこの弱い結合が切れるためであると考えられる。これに比してトランスグルタミナーゼによるゲルは温度が変化しても、その変化量は少なく、共有結合性の強いゲルである事が示唆された。事実両方のゲルを40°C以上にさらすとトランスグルタミナーゼによるゲルは、そのままであるが通常のゼラチンゲルは溶融した。

以上より、Glu-Lys架橋によつてゲルが生成されており、S-Sの架橋によるゲルではないと考えられる。

このようにして得られたゲル化物は、比較的短時間、即ち、1分以内、長くとも30分以内にてゲル化し、しかも一般のゲル化物と同等のゲル物性を備えたものである。

また、本発明で用いる蛋白含有溶液は単に蛋白と水との混合物に限らず、蛋白質、水及び油脂を混合したエマルジョンであつてもよい。

更にこのゲル化物は加熱することにより、強度

のより強いゲルを作ることができる。

本発明のゲル化物は、従来のゲル状食品と同様にヨーグルト、ゼリーなどとして用いることももちろん、未加熱で製造でき、熱に安定なゲルであるため、マイクロカプセルの素材、固定化酵素の素材などとしても用いることができるものである。

実施例 1

以下の方法によりトランスグルタミナーゼを調製した。モルモット肝800gに冷0.25Mシヨ糖溶液約2ℓ加え、20000rpm、2分でホモゲイズし、遠心分離(105000×g、5℃、1時間)を行ない上清を得た。

これを5mMトリス・塩酸緩衝液(2mMEDTA 含有、pH7.5)で平衡化してあるDEAEセルロースカラムに添加・吸着させた後、上記緩衝液の食塩濃度を0Mから1.0Mまで変化させる勾配溶離法で分画し、酵素活性の高い画分を得た。

これをゆつくりと攪拌しながら1%硫酸プロタミン40mlを添加し、遠心分離(14600×g、15分、5℃)で沈澱を集め、これを0.2Mトリス・酢酸緩衝液(pH6.0)に懸濁、ホモゲイズして洗い、遠心分離(2500×g、1分、5℃)で、沈澱を集

めた。

この沈澱より、0.05M硫酸を含む5mMトリス塩酸緩衝液(2mMEDTA含有、pH7.5)を添加し、ホモゲイズすることによつて、トランスグルタミナーゼを抽出した。これを3度繰り返し、集めた抽出液を5mMトリス・コハク酸緩衝液(2mMEDTA含有、pH6.0)で平衡化したカルボキシメチル・セルロースカラムに添加し、プロタミンを除去し、濾液に1MEDTA(pH8.0) 2.4mlと硫酸47.4gを加え、よく攪拌した後に、遠心分離(15000×g、10分、5℃)で沈澱を集めた。

これを10mMトリス・酢酸緩衝液(1mMEDTA 0.16M KCl 含有、pH6.0)に溶解し、遠心分離(27000×g、30分、5℃)で難溶物を除いた後、上清を同じ緩衝液で平衡化している10%アガロース(Bio Ge A-0.5M)でゲル濾過を行ない、活性の高い画分を集め、これを10~20mg/mlの濃度となるよう限外濾過(UM-10、アミコン社製)で濃縮し、トランスグルタミナーゼ溶液とした。この溶液を-30℃以下で凍結保存し、適時溶解し使用した(尚、これは常時5℃で操作し調製した。)

表1に示した基質蛋白にトランスグルタミナーゼを作用させ、ゲル化物を得た。

表

1

基質蛋白	調 整 法	ゲ ル 化
牛乳蛋白 ①αs1-カゼイン	生乳を遠心分離によつて脱脂しpH4.5~4.8に調整し、酸沈カゼインを得る。これよりZittle ^{※1} の方法に従つて6.6M尿素溶液に溶解し、水を加えて4.6M尿素溶液とする。生じる沈澱を遠心分離で集め、希NaOH溶液にとかし、pH7.2とする。これに酢酸アンモニウム-エタノールH ₂ Oを添加し、沈澱を除いて得られる上清をpH5.0に調整し、生成する沈澱を希NaOHにとかし、pH7.5とし、水に対して透析後、凍結乾燥し、αs1-カゼインを得た。	5重量%溶液を0.1Mトリス-塩酸緩衝液(5mM CaCl ₂ 、20mM ジチオスレイトール含有、pH7.6)を用い、1ml調整し、これに37℃でトランスグルタミナーゼを蛋白1mgに対して0.1ユニット加え、即座にゲル化した。
牛乳蛋白 ②Na-カゼイネート	サクラメントS(太陽化学 ^{※2} 及びSolac(New Zealand Dairy Board輸入元・日成共益 ^{※3}))	①と同様にしてゲルを得た。但し、10重量%の濃度でトランスグルタミナーゼを蛋白1mgに対して0.09ユニットを要した。
③大豆蛋白 11Sグロブリン	Thanh ^{※2} らの方法に従つて低温抽出脱脂大豆フレーク(味の素 ^{※4} 製)より、0.03Mトリス-塩酸緩衝液(10mM-メルカプトエタノール含有、pH8.0)で抽出し、抽出液をpH6.4に調整、遠心分離によつて沈澱を集め、標準緩衝液にとかし、pH7.6とし、遠心分離した上澄を透析後、凍結乾燥して11Sグロブリンとした。	②に同じ

基質蛋白	調 整 法	ゲル 化
④大豆蛋白 7Sグロブ リン	Thanh ^{*2} らの方法に従って、低温抽出脱脂大豆フレーク(味の素㈱製)より、0.03Mトリス-塩酸緩衝液(10mM2-メルカプトエタノール含有、pH8.0)で抽出し抽出液をpH6.4に調整、遠心分離によつて沈澱を除き、得られる上澄をpH4.8とし、生成する沈澱を集め、H ₂ Oに分散してpH7.0とし、透析後、凍結乾燥して7Sグロブリンとした。	②に同じ
⑤分離状大豆蛋白	「アジプロンS-2」(味の素㈱製)	②に同じ
⑥水抽出大豆蛋白	低温抽出脱脂大豆フレーク(味の素㈱製)を水に懸濁攪拌し、遠心分離後、上清を透析、凍結乾燥し、水抽出蛋白とした。	②に同じ
⑦酸沈澱大豆蛋白	低温抽出脱脂大豆フレーク(味の素㈱製)を0.03Mトリス-塩酸緩衝液(10mM2-メルカプトエタノール含有、pH8.0)に懸濁、攪拌し、遠心分離によつて上澄を得る。これをpH4.8に調整し、生じた沈澱を集め、上記緩衝液に溶解し、透析後、凍結乾燥して、酸沈澱蛋白とした。	②に同じ
⑧大豆蛋白 粒子	丸大豆を水に浸漬し3分間煮沸後、ホモゲナイザーで粉碎し、濾過(200mesh)し遠心分離して蛋白粒子とした(特開昭56-68356号の方法)	②に同じ
⑨大豆蛋白 ミセル	(特公昭56-31095号の方法)	②に同じ
⑩ゼラチン	メルク社製	10重量%溶液となるように0.1Mトリス-塩酸緩衝液(5mM CaCl ₂ 、20mMジチオスレイトール含有、pH7.6)を加え、これを60°Cに加熱しゼラチンを溶かす。すばやくトランスグルタミナーゼを蛋白1mgに対して0.09ユニットを加え、よく攪拌後、37°Cに保つと、即座にゲル化した。

*1 C.A.Zittle et al., J. Dairy Sci., 46, 1183(1963)

*2 V.H.Thanh et al., J. Agric. Food Chem., 24(6), 1117(1976)

実施例 2

α_1 カゼイン、Na-カゼイネート、大豆蛋白11Sグロブリン、水抽出大豆蛋白、各々500mgを0.1Mトリス塩酸緩衝液(5mM CaCl₂、20mMジチオスレイトール含有、pHを7.6) 3.5mlに溶解し、これに大豆油1.5mlを加えて20000rpmで3分間ホモゲナイズして乳化物を得た。これにトランスグルタミナーゼを蛋白1mgに対して0.09ユニット加えると即座にゲル化物を得た。

実施例 3

α_1 カゼイン、大豆蛋白11Sグロブリン及び大豆蛋白7Sグロブリンの2、5、10重量%溶液を0.1Mトリス・塩酸緩衝液(5mM CaCl₂、20mMジチオスレイトール含有pH7.6)で0.5ml作成

し、37°Cで各々にトランスグルタミナーゼを蛋白1mgに対して0.1ユニットの割合で加えて、ゲル化する可否を判定し、表2の結果を得た。

表 2

蛋白 \ 基質濃度	2.0%	5.0%	10.0%
α_{s1} カゼイン	△	○	○
大豆蛋白11Sグロブリン	×	△	○
大豆蛋白7Sグロブリン	×	×	○

○：ゲル化

△：弱いゲル

×：溶液のまま

実施例 4

表

3

蛋白 \ 酵素量(ユニット)	5×10^{-4}	1×10^{-3}	0.01	0.05	1.0	2.0
5重量% α_{s1} カゼイン	△	○	◎	◎	◎	◎
10重量%11Sグロブリン	×	×	○	○	○	◎

◎：即座にゲル化した

○：1時間以上にゲル化

△：ゲル化するが弱いゲル

×：溶液のまま

実施例 5

5 mM CaCl_2 と20 mMジチオスレイトールを含んだpH7.0～pH9.0のトリス塩酸緩衝液を調製し、それを用いて、5重量% α_{s1} カゼイン溶液と10重量%大豆蛋白11Sグロブリン溶液を各0.8mlずつ作成し、トランスグルタミナーゼを蛋白1mgに対して0.1ユニット添加してゲル化するか否かを観察した。結果を表4に示す。

表 4

蛋白 \ pH	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
5重量% α_{s1} カゼイン	○	○	○	◎	◎
10重量%11Sグロブリン	◎	◎	○	×	×

◎：即座にゲル化

○：ややゲル化に時間を要した

×：溶液のまま

実施例 6

直径9.3mm、高さ15mmのテストピース作成容器

* α_{s1} カゼインの5重量%溶液と大豆蛋白11Sグロブリンの10重量%溶液を0.1Mトリス塩酸緩衝液(5 mM CaCl_2 、200 mMジチオスレイトール含有、pH7.6)で調製し、これら溶液0.8mlに対して、トランスグルタミナーゼを蛋白1mgあたり 5×10^{-4} ～2.0ユニット添加してゲル化するか否かを観察したところ、表3に示すような結果を得た。

10

*

に試料溶液1mlを流し込み、下記に示す様にゲル化させて円筒ゲルを作成し、これをレオログラム(東洋精機製作所製、CV-100)にて、18から25℃まで昇温させ、各温度の貯蔵弾性率を測定した。

① セラチン冷却ゲル

10重量%溶液となるように、セラチンに水を加え、60℃、3分で完全にセラチンを溶解後、1mlをテストピース作成容器に流し込み、3℃にて20分放置し、ゲル化させ室温に戻して測定した。

35 ② セラチンTGaseゲル

セラチンに10重量%溶液となるように0.1Mトリス塩酸溶液(5 mM CaCl_2 、20 mMジチオスレイトール含有、pH7.6)を加え、60℃、3分で完全にセラチンを溶解し、テストピース作成容器に流し込み、すばやくトランスグルタミナーゼをセラチン1mgに対して0.1ユニットの割合で加え、室温に1時間放置しゲル化させ、測定した。

結果を図1に示す。セラチン冷却ゲルは温度が

増加するとともに貯蔵弾性率が著しく低下するが、それに比してゼラチンTGaseゲルは温度変化の影響が少なかった。

実施例 7

α_{s1} カゼインについて5重量%、大豆11Sグロブリンについては10重量%となるように0.1Mトリス・塩酸緩衝液(5 mM CaCl_2 、20 mMジチオスレイトール含有、pH7.6)で1 mlを調製し、これにトランスグルタミナーゼを蛋白1 mgに対して0.1ユニットを加えてゲルを得た。このゲルを、さらに100°Cに20分間保った後、室温まで冷却した。

ゲル化させた直後のゲルと、加熱処理したゲルについてレオメーター(不動工業株、NRM-2002J)で、プランジャー5Φ、ボール型)を侵入させた時の最高荷重を測定し、ゲル強度とした。

結果を表5に示す。

表 5

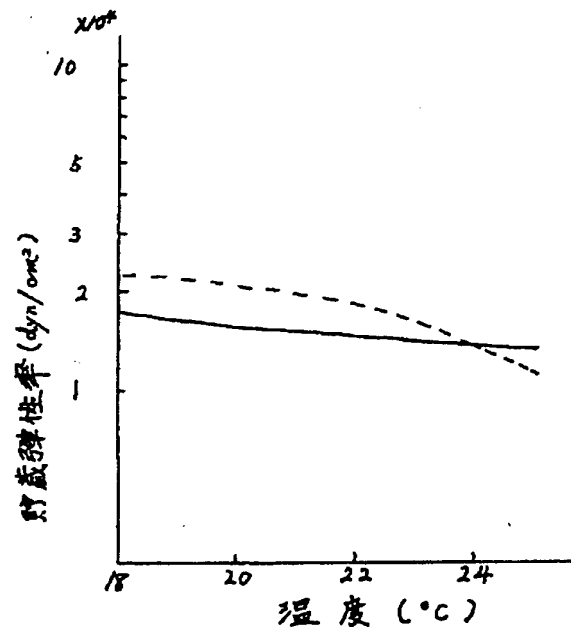
蛋白	未加熱	加熱処理後
5重量% α_{s1} ゲル	12.0g	25.6g
10重量% 11Sゲル	2.8g	37.0g

上表からわかるようにいずれの場合も加熱処理した方がゲル強度が増加した。

図面の簡単な説明

図1は実施例6の結果を示す。図中、横軸は温度(°C)、縦軸は貯蔵弾性率(dyn/cm²)であり、実線は本発明のゼラチンTGaseゲルを、破線はゼラチン冷却ゲルを示す。

図 1



第1部門(1) 特許法第64条の規定による補正の掲載 平 4.12.21発行

昭和57年特許願第31978号(特公平1-50382号、平1.10.30発行の特許公報1(1)-47〔590〕号掲載)については特許法第64条の規定による補正があつたので下記のとおり掲載する。

Int. Cl.⁸
A 23 J 3/00
A 23 L 1/056

特許第1689614号
識別記号 庁内整理番号
7236-4B

2121-4B A 23 L 1/04

記

- 1 「発明の名称」の項を「ゲル状食品の製造法」と補正する。
- 2 「特許請求の範囲」の項を「1 蛋白質濃度5重量%以上のカゼインもしくはゼラチン含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上添加しpH6~9の範囲でゲル化させるか、又は(ii)蛋白質濃度10重量%以上的大豆蛋白含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して10ユニット以上添加しpH6~8の範囲でゲル化させることを特徴とするゲル状食品の製造法。」と補正する。
- 3 第1欄7行「ゲル化物」を「ゲル状食品」と補正する。
- 4 第1欄23行~第1欄26行「即ち、……である。」を「(i)蛋白質濃度5重量%以上のカゼインもしくはゼラチン含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上添加しpH6~9の範囲でゲル化させるか、又は(ii)蛋白質濃度10重量%以上的大豆蛋白含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して10ユニット以上添加しpH6~8の範囲でゲル化させることを特徴とするゲル状食品の製造法である。」と補正する。
- 5 第1欄27行~第2欄9行「本発明に……あればよい。」を「本発明において、蛋白質としてカゼインもしくはゼラチンを用いる時は、該蛋白質を5~15重量%含有するものを用いるのが好ましく、蛋白質として大豆蛋白を用いる時は、該蛋白質を10~15重量%含有するものを用いるのが好ましい。」と補正する。
- 6 第2欄14行~第2欄20行「蛋白溶液……させる。」を「蛋白質としてカゼインもしくはゼラチンを用いる場合、蛋白質濃度が5重量%未満でかつ溶液のpHが6~9の範囲外だと良好なゲル状食品を得ることができない。又、蛋白質として大豆蛋白を用いる場合、蛋白質濃度が10重量%未満でかつ溶液のpHが6~8の範囲外だと良好なゲル状食品を得ることができない。
この蛋白含有溶液に、蛋白質としてカゼインもしくはゼラチンを用いる場合には、蛋白1gに対してトランスグルタミナーゼを1ユニット以上添加し、蛋白質として大豆蛋白を用いる場合、蛋白1gに対してトランスグルタミナーゼを10ユニット以上添加してゲル化させる。」と補正する。
- 7 第5欄2行~第5欄7行「本発明の……る。」を「本発明のゲル状食品は、従来のゲル状食品と同様にヨーグルト、ゼリーなどとして幅広く使用することができる。」と補正する。
- 8 第7欄31行~第7欄39行「実施例2……を得た。」を削除する。
- 9 第7欄40行「実施例3」を「実施例2」と補正する。
- 10 第9欄12行「実施例4」を「実施例3」と補正する。
- 11 第9欄24行「実施例5」を「実施例4」と補正する。
- 12 第9欄43行「実施例6」を「実施例5」と補正する。
- 13 第11欄4行「実施例7」を「実施例6」と補正する。
- 14 第12欄12行「実施例6」を「実施例5」と補正する。

(1550) 11/11/11